Aus dem physiologischen Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. Ebbecke.

Über die Löslichkeit der Proteine des frischen, gealterten und ermüdeten Kaltblütermuskels in verschiedenen anorganischen und organischen Extraktionsgemischen.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn.

Vorgelegt am 5. Juli 1939

von

Dorothea Gebers geb. Mellinghoff

aus Bonn.

Bonn 1939
Anton Brand.

Gedruckt
mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. Deuticke
Korreferent: Prof. Dr. Ebbecke.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Nachdem in den letzten Jahren der Betriebsstoffwechsel des tätigen Muskels weitgehend aufgeklärt wurde, finden nuerdings die Vorgänge an den Muskeleiweißkörpern steigendes Interessse. Mit physikalischen, physikochemischen und chemischen Methoden wird versucht, die Veränderungen an den Muskelproteinen bei der Tätigkeit qualitativ und quantitativ zu erfassen. Eine Methode, die solche Veränderungen im tätigen Muskel quantitativ zu verfolgen gestattet und zur Feststellung gesetzmäßiger Beziehungen zwischen der Größe dieser Änderungen und der Größe der Arbeitsleistung führte, ist die Methode der Bestimmung der Löslichkeit der Muskelproteine von H. J. Deuticke[1][2]). Bei der Ausarbeitung dieser Methode hatte sich bereits gezeigt (H. J. Deuticke[1][2]), J. Hensay[3]), daß für die Löslichkeit der lebensfrischen Muskeleiweißkörper und für die Größe und Richtung der durch die Tätigkeit, Ermüdung und Starre gesetzten Löslichkeitsänderung die Zusammensetzung der Extraktionsflüssigkeit, die Art der Salze wie ihre Konzentration, und ferner der p_H von Bedeutung sind. Als günstigstes Extraktionsmmitel zur Erfassung von Löslichkeitsänderungen hatte sich in diesen Arbeiten ein m/10 Phosphatpuffergemisch von p_H 7,2 erwiesen. Ferner waren Kaliumsalze brauchbarer als Natriumsalze. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, wie weit Zusätze anderer anorganischer und auch organischer einschließlich muskeleigener Substanzen zum Extraktionsgemisch die Proteinlöslichkeit im frischen, gealterten und ermüdeten Muskel beeinflussen. Es war zu hoffen, daß nachweisbare Änderungen der Proteinlöslichkeit in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Extraktionsmittels auch Rückschlüsse zuließen auf die am Eiweißmolekül bei der Tätigkeit erfolgenden chemischen Änderungen, so daß diese Untersuchung vielleicht mit als Grundlage einer experimentell belegten Kontraktionstheorie dienen konnte.

Methodik.

In den „Alterungsversuchen“ wurden Gastrocnemien und Oberschenkelmuskulatur möglichst frisch gefangener Frösche nach der Dekapitation der Tiere rasch abpräpariert, durch vorsichtiges Ausstreichen auf Filterpapier von Blut befreit und auf eisgekühlter Glasplatte sorgfältig, unter Entfernung von Sehnen und Nerven, mit der Schere zerkleinert. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Muskelbrei in zwei Teile geteilt und aliquote Anteile (0,3—0,5 g) der einen Hälfte sofort grob auf der Hornwaage abgewogen und in flüssige Luft versenkt.[1]) Die gefrorenen Portionen wurden, nach gründlicher Zerkleinerung im Porzellanmörser mit dem Pistill, dauernd unter flüssiger Luft, in analytisch vorgewogene, 50 ccm fassende Erlenmeyer-Kolben mit Schliffstopfen eingefüllt, die 30 ccm der jeweiligen Pufferlösung enthielten. Unter dauerndem Umschütteln taute die Muskulatur rasch auf. Die so beschickten Erlenmeyer-Kolben wurden analytisch nachgewogen und zur Extraktion 12—15 Stunden unter häufigem Umschütteln im Eisschrank belassen. Die zweite Breihälfte blieb eine bestimmte Zeit (½ bis 1 Stunde) in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur, sie „alterte“; anschließend wurden von ihr ebenfalls aliquote Teile auf der Hornwaage abgewogen und analog dem frischen Muskelbrei weiter behandelt.

Zu den Arbeitsversuchen kamen jedesmal 5 bis 6 Paar Gastrocnemien möglichst frisch gefangener Frösche zur Verwendung. Von den beiden durch vorsichtiges Ausstreichen auf Filterpapier vom Blut befreiten Gastrocnemien wurde der eine als Arbeitsmuskel an der Achillessehne und am proximalen Muskelende zwischen zwei Metallhaken als Elektroden ausgespannt und in ein Kopyloff-Gefäß[2]) versenkt, das einige Kubikzentimeter Ringerlösung enthielt und nach oben mit feuchtem Filterpapier abgedeckt war. Der Muskel war so

---

[1]) Anmerkung: Kontrollversuche zeigten, daß weder die Herstellung des Muskelbreies und die damit verbundene Verzögerung, noch das Gefrieren die Proteinlöslichkeit beeinflussen. Dagegen ist gute Zerkleinerung — auch nach dem Gefrieren — Voraussetzung einer unter den gegebenen Bedingungen möglichst vollständigen Extraktion.

vor Verdunstung geschützt, ohne selbst mit Flüssigkeit in Berührung zu kommen. Die Ringerlösung wurde mit Stickstoff durchperlt, um die Ermüdung des mit meist 10 g belasteten Muskels zu beschleunigen. Gereizt wurde mit Einzelinduktionsschlägen (40 Schließungsschläge pro Minute) bei zunächst möglichst niedriger, mit fortschreitender Ermüdung langsam ansteigender Spannung (in den Tabellen durch den Rollenabstand zum Ausdruck gebracht). Der vollständig ermüdete, aber keinesfalls totenstarre Muskel wurde in flüssige Luft versenkt gleichzeitig mit dem zweiten Gastrocnemius, der als Kontrollmuskel während der Arbeitszeit seines Brudermuskels ungereizt in einer feuchten Kammer unter Sauerstoffzufuhr gehangen hatte. Nachdem sämtliche Muskeln, natürlich nach z. T. verschieden langer Arbeitszeit, ermüdet und in flüssige Luft gebracht waren, erfolgte die Zerkleinerung und Extraktion der Gastrocnemien wie oben beschrieben.

Nach der 12—15stündigen Extraktion wurde durch Schwarzbandfilter filtriert und in aliquoten Teilen der Filtrate der gesamte lösliche Stickstoff und der Reststickstoff nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt und als deren Differenz der lösliche Eiweißstickstoff errechnet. Zur Bestimmung des gesamten löslichen Stickstoffes wurden jeweils 2 ccm Filtrat verascht, zur Bestimmung des Reststickstoffes wurden meist 15 ccm des Filtrates mit je 10 ccm 4%iger HCl und 5%igem $HgCl_2$ nach Schenck enteiweißt, mit H_2S entquecksilbert, entlüftet und 10 ccm des so gewonnenen Filtrates verascht. In einigen Breiversuchen mit vielen Einzelansätzen begnügte ich mich, den Reststickstoff nur in zwei Ansätzen zu bestimmen, die natürlich gut übereinstimmende Werte ergeben mußten. Alle Analysen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt; die in den Tabellen angegebene prozentuale Löslichkeitsänderung ist berechnet auf die Werte des frischen bzw. Ruhemuskels.

Das zur Extraktion verwandte Phosphatpuffergemisch enthielt in den meisten Versuchen, wenn nicht anders angegeben, primäres und sekundäres Kaliumphosphat gleicher Konzentrationen im Verhältnis 1:4, wobei der p_H 7,2 betrug. Bestimmten Volumina dieses Puffergemisches waren kleinere Volumina der zu prüfenden Salz-

Tabelle 1

Einfluß von Kaliumjodid auf die Löslichkeit frischer und gealteter Muskelproteine im Phosphatpuffergemisch.

Versuchs-Nr. / Datum	Aufbewahrung des Muskelbreies	Puffergemisch zur Extraktion		Frischer Muskelbrei: Löslicher Stickstoff in % des Muskelgewichtes. Gesamt	Rest	Eiweiß	Gealterter Muskelbrei: Gesamt	Rest	Eiweiß	Änderung d. Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im gealterten
1 26. 10. 37	60' bei 22°	6 T*) m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/5KJ	1,320 1,508	0,324 0,324	0,996 1,184	1,249 1,348	0,320 0,320	0,929 1,028	— +
2 11. 3. 31	40' bei 20°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/25KJ u. 1T. m/5KJ u. 1T. m/10KJ	1,338 1,726 1,539 1,365	0,275 0,275 0,264 0,262	1,063 1,451 1,275 1,103	1,193 1,451 1,300 1,191	0,275 0,266 0,261 0,263	0,918 1,185 1,039 0,928	— + — +
3 7. 12. 37	60' bei 20°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/10KJ u. 1T. m/50KJ u. 1T. m/100KJ	1,077 1,128 1,107 1,071	0,308 0,307 0,307 0,307	0,769 0,821 0,800 0,764	1,036 1,084 1,065 1,057	0,308 0,308 0,308 0,308	0,728 0,776 0,757 0,749	— — = —
4 27. 9. 37	45' bei 19°	5T. m/20 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/5KJ u. 1T. m/30KJ u. 1T. m/100KJ	1,044 1,080 1,052 1,043	0,284 0,249 0,268 0,276	0,760 0,831 0,784 0,767	1,059 0,993 1,059 1,044	0,284 0,251 0,271 0,268	0,775 0,742 0,788 0,776	+ — + +
6 7. 9. 37	45' bei 25°	5T. m/20 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/30KJ	0,958 0,942	0,295 0,285	0,663 0,657	0,909 0,963	0,297 0,294	0,612 0,669	— +
6 21. 9. 37	50' bei 20°	5T. m/20 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O u. 1T. m/30KJ	0,798 0,827	0,250 0,247	0,548 0,580	0,753 0,824	0,254 0,252	0,499 0,572	— —

*) T. bedeutet Volumenteile.

lösungen in den angegebenen Konzentrationen, in den Kontrollansätzen Wasser, zugesetzt (Einzelheiten siehe in den Tabellen). Die in den Tabellen vermerkten p_H-Messungen wurden mit dem Lautenschlägerschen Ionometer ausgeführt.

Versuchsergebnisse.

A. Versuche mit Muskelbrei.

In den Versuchen der Tabelle 1 ist der Einfluß geprüft, den Kaliumjodid, in verschiedenen Konzentrationen dem m/10 (Versuch 1—3) bzw. m/20 (Versuch 4—6) Kaliumphosphatpuffer von p_H 7,2 zugesetzt, auf die Proteinlöslichkeit im frischen und im gealterten Muskelbrei ausübt.

Im Versuch 1 zeigt sich, daß der Zusatz von m/5 K-Jodid die Löslichkeit der Proteine des frischen und auch des gealterten Muskels stark heraufsetzt, im frischen Muskel mit einer Löslichkeitssteigerung um 18,0% gegenüber dem reinen Phosphatwert, jedoch wesentlich stärker als im gealterten (10,7%), dessen Proteine demnach Jodidionen gegenüber weniger empfindlich sind als die lebensfrischer Muskeln. Infolgedessen wirkt sich der Einfluß der Alterung bei Verwendung des jodidhaltigen Extraktionsmittels mit einer Löslichkeitsabnahme von 13,2% wesentlich stärker aus als im reinen Phosphatpuffer, in welchem die Abnahme nur 6,7% betrug.

Bestätigt wird dieses Ergebnis im nächsten Versuch, in dem die Konzentration des Kaliumjodids variiert wurde. Zusatz von m/2,5 Jodid setzt zwar die absolute Proteinlöslichkeit noch mehr herauf, um 36,5% im frischen und um 29,1% im gealterten Muskelbrei gegenüber den Phosphatwerten, aber die Löslichkeitsabnahme bei der Alterung ist prozentisch dabei nicht größer als im Ansatz mit m/5 Jodidzusatz. Die m/10 K-Jodid-Konzentration läßt dagegen den löslichkeitssteigernden Effekt des Jods nur noch wenig erkennen, ein Ergebnis, das der dritte Versuch dieser Tabelle bestätigt, der außerdem zeigt, daß bei Zusatz sehr schwacher K-Jodid-Konzentration, nämlich m/100, die Löslichkeitsabnahme im gealterten Muskelbrei gegenüber der im reinen Phosphatpuffergemisch beobachteten prozentisch sogar geringer ist.

Die nächsten Versuche 4—6 wurden in Anlehnung an unveröffentlichte Versuche von H. J. Deuticke durchgeführt, in denen Phosphatpuffer von p_H 7,2, die stärker als m/5 und schwächer als m/10 konzentriert waren, eine bei m/5 und m/10 nachweisbare Lös-

Tabelle 2

Einfluß der Halogene auf die Löslichkeit frischer und gealterter Muskelproteine im Phosphatpuffergemisch.

Versuchs-Nr. Datum	Aufbewahrung des Muskelbreies	Puffergemisch zur Extraktion		Löslicher Eiweißstickstoff in % des Muskelgewichtes. Frischer Muskelbrei	Gealterter Muskelbrei	Änderung d. Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im gealterten Muskel berechnet auf Frischmuskel in %
7	30' bei	6T. m/10	u. 1T. H_2O	0,944	0,886	— 6,1
	20°	K-Phosphat	u. 1T.m/5K-Jodid	1,102	0,962	—12,7
9. 3. 31		p_H 7,2	u.1T.m/5K-Bromid	0,961	0,872	— 9,3
			u. 1T. H_2O	0,882	0,877	— 0,6
8	60' bei	5T. m/10	u. 1T. m/5KJ	1,069	0,917	—14,2
	21°	K-Phosphat	u. 1T. m/5KBr	0,967	0,880	— 9,0
12. 10. 37		p_H 7,2	u. 1T. m/5KCl	0,933	0,877	— 6,0
			u. 1T. m/5KF	0,929	0,813	—12,5
9	60' bei	6T. m/10	u. 1T. H_2O	0,919	0,867	— 5,7
	21°	K-Phosphat	u. 1T. m/5KCl	0,948	0,873	— 7,9
15. 10. 37		p_H 7,2	u. 1T. m/5KF	0,935	0,915	— 2,1
10		5T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O	0,849	0,818	— 3,7
	50' bei 22°		u. 1T. m/5KF	0,818	0,762	— 6,9
		6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O	0,848	0,797	— 6,0
19. 10. 37			u. 1T. m/5KF	0,846	0,842	— 0,5
11	50' bei	6T. m/10	u. 1T. H_2O	1,034	0,941	— 8,4
	22°	K-Phosphat	u. 1T. m/2KF	1,012	0,954	— 5,7
22. 10. 37		p_H 7,2	u. 1T. m/5KF	0,948	0,915	— 3,5
			u. 1T. m/10KF	0,975	0,909	— 6,8

lichkeitsänderung von Muskelproteinen nicht mehr hatten erkennen lassen. Im Versuch 4 steigert Zusatz von m/5 K-Jodid zu dem zum Nachweis der Löslichkeitsänderung ungeeigneten m/20 K-Phosphatpuffer die Löslichkeit der frischen und hemmt die der gealterten Proteine, so daß eine Abnahme um 10,7% als Folge der Alterung resultiert, während die schwächeren Jodidkonzentrationen (m/30 und

m/100) ohne Einfluß auf die Proteinlöslichkeit sind. In den beiden folgenden Versuchen 5 und 6 wird eine in m/20 Phosphatpuffer noch nachweisbare Löslichkeitsabnahme durch den Zusatz von m/30 K-Jodid aber nicht nur nicht verstärkt sondern sogar aufgehoben und zwar dadurch, daß hier, wie in Versuch 3, die m/100 Jodid-Konzentration die Löslichkeit der gealterten Proteine stärker begünstigt als die der lebensfrischen Proteine.

Nachdem sich als günstiges Extraktionsmittel für Muskelproteine, um einen Alterungseffekt zu zeigen, ein m/10 K-Phophatpuffer mit einem Zusatz von m/5 K-Jodid erwiesen hatte, wurde die Wirksamkeit der übrigen Halogene unter den gleichen Bedingungen geprüft. In den hierher gehörigen Versuchen der Tabelle 2 ergab sich ebensowenig wie in denen der Tabelle 1 und den folgenden Versuchen dieser Arbeit ein Einfluß der maximal einstündigen Alterung auf den Reststickstoffgehalt. Infolgedessen sind in dieser und den folgenden Tabellen die Reststickstoffwerte fortgelassen und nur die Eiweißstickstoffwerte wiedergegeben. Aus Versuch 7 ist ersichtlich, daß auch das Bromid auf die Proteine des frischen Muskels löslichkeitssteigernd wirkt, jedoch ungleich schwächer als das Jodid. Auf die Löslichkeit der Proteine des gealterten Muskelbreies bleibt der Zusatz von Bromid im Gegensatz zu dem von Jodid ohne Einfluß, sodaß als Ergebnis dieser verschiedenen Einflüsse die prozentische Löslichkeitsabnahme bei der Alterung im Bromidphosphatpuffer mit 9% zwar stärker als im reinen Pphosphat (6%), aber schwächer als im Jodidphosphatpuffer (13%) in Erscheinung tritt. Diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung in Versuch 8, in dem sämtliche Halogene in m/5 Konzentration dem Phosphatpuffer zugesetzt wurden. Bezüglich des Chlorids stellt sich heraus, daß es wie das Bromid, wenn auch noch schwächer als dieses, begünstigend auf die Löslichkeit der frischen Muskelproteine wirkt und auf den gealterten Muskelbrei ohne Einfluß bleibt, ein Verhalten, das im Versuch 9 bestätigt wird. Dagegen steigert Fluoridzusatz im Versuch 8 zwar die Löslichkeit des frischen Muskeleiweißes auch noch um einen geringen Betrag, aber im gealterten Muskelbrei hemmt es die Löslichkeit stark und

bewirkt dadurch eine prozentische Löslichkeitsabnahme als Folge der Breiaufbewahrung von 12,5%.

Dieses Verhalten des Fluorids ist weitgehend abhängig von seiner Konzentration. Im Versuch 9 wird es z. B. nicht bestätigt. Hier ist beim Fluoridzusatz auch im gealterten Mukelbrei eine Er-

Tabelle 3

Einfluß von Rhodanid und Sulfosalicylat auf die Löslichkeit frischer und gealterter Muskelproteine im Phosphatpuffergemisch.

Versuchs-Nr. / Datum	Aufbewahrung des Muskelbreies	Puffergemisch zur Extraktion		Löslicher Eiweißstickstoff in % des Muskelgewichtes: Frischer Muskelbrei	Gealterter Muskelbrei	Änderung d. Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im gealterten Muskel, berechnet auf Frischmuskel in %
12	30' bei 20°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O	0,961	0,853	—11,2
			u. 1T. m/4K Rhodanid	1,002	0,801	—20,1
1. 3. 38			u. 1T. m/5K-R.	1,045	0,801	—23,4
13	60' bei 22°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O	0,996	0,929	— 6,7
			u. 1T. m/5K-R.	1,125	0,839	—25,4
26. 10. 37			u. 1T. m/50K-R.	0,675	0,622	— 7,9
14	70' bei 18°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,2	u. 1T. H_2O	0,597	0,571	— 4,3
			u. 1T. m/2K-Sulfosalicylat	1,351	1,138	—15,8
			u. 1T. m/5K-S.	1,088	0,906	—16,8
24. 5. 38			u. 1T. m/10K-S.	0,787	0,713	— 9,4
			u. 1T. m/50K-S.	0,629	0,610	— 3,0
			u. 1T. m/100K-S.	0,607	0,582	— 4,1
15	65' bei 18°	6T. m/10 K-Phosphat p_H 5,04	u. 1T. H_2O	0,437	0,448	+ 2,5
			u. 1T. m/5K-S. p_H 5,18	0,563	0,539	— 4,2
		6T. m/10 K-Phosphat p_H 5,91	u. 1T. H_2O	0,496	0,499	+ 0,6
			u. 1T. m/5K-S. p_H 5.97	0.588	0,581	— 1,2
		6T. m/10 K-Phosphat p_H 7,93	u. 1T. H_2O	0,697	0,629	— 9,8
15. 6. 38			u. 1T. m/5K-S. p_H 7,94	1,028	0,899	—12,6

höhung der Proteinlöslichkeit und infolgedessen ein prozentisch geringerer Alterungseffekt festzustellen. Aber im Versuch 9 beträgt das Verhältnis des Kaliumphosphatpuffers zum jeweiligen Halogenzusatz 6:1, im Versuch 8 dagegen 5:1, und diese geringen Konzentrationsunterschiede bzw. das verschiedene Mischungsverhältnis sind, wie der Versuch 10 zeigt, für die verschiedenen Versuchsergebnisse verantwortlich zu machen. Daß es wirklich das Mischungsverhältnis und nicht eine einfache Steigerung der Fluoridkonzentration ist, zeigt Versuch 11, in dem der Zusatz von m/2 K-Fluorid den Unterschied in der Löslichkeit der frischen und gealterten Proteine nicht steigerte, sondern abschwächte.

In den bisher mitgeteilten Versuchen hatte sich also gezeigt, daß die Halogene, in bestimmter Konzentration einem Phosphatpuffer von pH 7,2 zugesetzt, maßgeblich die Löslichkeit von Muskelproteinen beeinflussen. Sie ordnen sich in der Reihenfolge: Jodid, Bromid, Chlorid, Fluorid, d. h. entsprechend ihrer Stellung in der lyotropen Reihe, wobei die Löslichkeit der lebensfrischen Proteine durch das Jodid am stärksten, durch das Fluorid am schwächsten, wenn überhaupt, gesteigert wird. Im gealterten Muskelbrei ist der löslichkeitssteigernde Einfluß des Jodids ungleich geringer, Bromid- und Chloridzusatz sind ohne Einfluß, und Fluorid mindert sogar bei einem Verhältnis von Phosphat : Fluorid wie 5:1 die Proteinlöslichkeit. Die Breiaufbewahrung führt also zu einer herabgesetzten Alterationsfähigkeit der Muskelproteine.

Um diesen Befund weiter zu verfolgen, wurden noch einige andere Anionen in den Bereich der Untersuchung miteinbezogen und zwar das Rhodanid, das wie das Jodid auf dem quellungsbegünstigenden Ende der lyotropen Reihe steht, und das Sulfosalicylat*).

Die beiden Versuche 12 und 13 der Tabelle 3 bringen zum Ausdruck, daß der Zusatz von Rhodanid in optimaler, d. h. m/4 und m/5 Konzentration zum Phosphatpuffer die Löslichkeit der Muskelproteine im frischen Brei herauf- und im gealterten herab-

*) Anmerkung: In den Versuchen mit Rhodanidzusatz wurde der Stickstoffgehalt der rhodanidhaltigen Puffergemische nach dem Kjeldahlverfahren ermittelt und rechnerisch in Abzug gebracht.

setzt, so daß als Folge der Alterung die Löslichkeitsabnahme im Phosphatrhodanidgemisch auf 20—25% gegenüber 7—11% im reinen Phosphatgemisch ansteigt. Das Rhodanid kommt in dieser Konzentration in seiner Wirkung weniger dem Jodid, dem es in der lyotropen Reihe am nächsten steht, sondern dem Bromid und dem Fluorid nahe. Denn Bromidzusatz führte bei Extraktion des frischen Muskelbreies stets zu einer Löslichkeitssteigerung, ließ die Löslichkeit der gealterten Proteine unbeeinflußt, während Fluoridzusatz die Löslichkeit der gealterten Proteine häufig herabsetzte. In schwächerer, in m/50 Konzentration, hemmt, wie Versuch 13 zeigt, zugesetztes Rhodanid ausschließlich die Proteinlöslichkeit und zwar in erheblichem Umfange. Nicht nur im gealterten sondern auch im lebensfrischen Muskelbrei betrug die Löslichkeitsminderung gegenüber den im reinen Phosphatgemisch gefundenen Werten 32 bzw. 33%.

Das Sulfosalicylat, daß wie alle bisher geprüften Anionen als K-Salz zugesetzt wurde, im Versuch 14 in m 2 bis m 100 Konzentration, steigerte bei p_H 7,2 wie das Jodid die Löslichkeit der frischen und der gealterten Muskelproteine, aber ungleich stärker noch als das Jodid. So betrug im Versuch 14 die Steigerung bei m 2 und m 5 Sulfosalicylatzusatz gegenüber dem Werten im reinen Phosphatpuffer-126 bzw. 82% für den frischen und 99 bzw. 59% für den gealterten Muskelbrei, während im Versuch 2 (Tabelle 1) z. B. der Jodidzusatz von m/2,5 und m 5 die Proteinlöslichkeit nur um 37 bzw. 20% und um 29 bzw. 13% steigerte. Je schwächer die Sulfosalicylatkonzentration, umso geringer wurde beim frischen und beim gealterten Muskel die Differenz zum Phosphatpuffer. Doch konnte hier im Gegensatz zum Jodid und Rhodanid bei niedriger Konzentration keine Löslichkeitshemmung im Vergleich zum Phosphatpuffer allein festgestellt werden. Der prozentisch höchste Unterschied zwischen frischen und gealtertem Muskelbrei wurde auch beim Sulfosalicylat bei Zusatz von m/5 Sulfosalicylatlösung gefunden.

Im schwach sauren Gebiet, bei p_H 5 und 6, bei dem auch ich (siehe Versuch 15) in Bestätigung von H. J. Deuticke[1]) und J. Hensay[2]) die Proteinlöslichkeit geringer als bei p_H 7 und 8 und keine Unterschiede zwischen frischem und gealtertem Muskelbrei

fand, führt Sulfosalicylatzusatz ebenfalls zu einer Löslichkeitssteigerung, freilich ohne daß dadurch ein Alterungseffekt im Sinne einer Löslichkeitsabnahme sicher nachweisbar wurde. Bei p_H 8 nimmt wie bei p_H 7,2 die Proteinlöslichkeit durch den Sulfosalicylatzusatz erheblich zu, und auch der Unterschied zwischen frischem und gealtertem Muskelbrei tritt bei diesem p_H prozentisch wieder stärker in Erscheinung.

Die bisher festgestellte Steigerung der Löslichkeit lebensfrischer Muskelproteine durch Zusatz von m/5 Jodid, Bromid, Chlorid, Rhodanid und Sulfosalicylat zum Extraktionsmittel sowie die geminderte Alterationsfähigkeit der gealterten Muskelproteine, die in einer Unbeeinflußbarkeit durch Bromid- und Chloridzusatz und beim Rhodanidzusatz sogar in einer Herabsetzung der Proteinlöslichkeit gegenüber dem reinen Phosphatpuffer zum Ausdruck kam, wurde in etwa neutralem Phosphatpuffergemisch (p_H 7,2) beobachtet. Nun ist bereits von J. Hensay[2]) festgestellt worden, daß im stark sauren Acetatgemisch als Extraktionsmittel die kolloidchemischen Zustandsänderungen der Muskelproteine bei der Alterung und übrigens auch bei der Tätigkeit durch eine Löslichkeitszunahme zum Ausdruck kommen. Diesen Befund deutete J. Hensay damit, daß im aufbewahrten Muskelbrei und im tätigen Muskel ein stärker alkalischer Eiweißkörper entsteht. Es fragte sich nunmehr, welche Art Änderung die Löslichkeit lebensfrischer und gealterter Muskelproteine bei Zusatz der bisher untersuchten Anionen zum stark sauren Acetatgemisch erfährt. In den in dieser Hinsicht angestllten Versuchen wurde entsprechend den Erfahrungen von J. Hensay[3]) nicht das Kalium- sondern das Natrium-Acetat verwandt, und zwar wurde es in m/10 Lösung mit m/10 Essigsäure in einem Verhältnis von 15 : 40 gemischt, sodaß ein Essigsäure-Na Acetatpuffer von p_H 4,2 als Standardacetatgemisch resultierte.

Tabelle 4

Einfluß der Halogene, des Rhodanids und des Sulfosalicylats auf die Löslichkeit frischer und gealterter Muskelproteine im sauren Acetatpuffergemisch.

Versuchs-Nr. / Datum	Aufbewahrung des Muskelbreies	Puffergemisch zur Extraktion		Löslicher Eiweißstickstoff in % des Muskelgewichtes: Frischer Muskelbrei	Gealterter Muskelbrei	Änderung d. Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im gealterten Muskel, berechnet auf Frischmuskel in %
16	60' bei 21°	6T. m/10 Na-Acetat p_H 4,22	u. 1T. H_2O	1,024	1,161	+13,4
			u. 1T. m/5KJ	0,652	0,672	+ 3,1
23. 11. 37			u. 1T. m/5KBr	0,739	0,794	+ 7,4
			u. 1T. m/5KCl	0,856	0,933	+ 9,0
			u. 1T. m/5KF	0,868	1,003	+15,6
17	60' bei 25°	6T. m/10 Na-Acetat p_H 4,22	u. 1T. H_2O	0,973	1,127	+15,8
			u. 1T. m/5KJ	0,631	0,653	+ 3,5
24. 10. 37			u. 1T. m/5KCl	0,830	0,893	+ 7,6
			u. 1T. m/5K-R.	0,384	0,373	— 2,9
18	55' bei 21°	6T. m/10 Na-Acetat p_H 4,22	u. 1T. H_2O	1,056	1,199	+13,5
			u. 1T. m/5KBr	0,781	0,831	+ 6,4
30. 11. 37			u. 1T. m/5K-R.	0,263	0,275	+ 4,6
			u. 1T. m/5K-S.	0,168	0,172	+ 2,4

Aus Versuch 16 der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß hier im stark sauren Bereich der Halogenzusatz die Löslichkeit der frischen und der gealterten Proteine gegenüber ihrer Löslichkeit im reinen Acetatpuffer nicht begünstigt, sondern herabgesetzt, beim Jodid am stärksten, beim Fluorid am schwächsten; die Halogene ordnen sich auch hier wieder nach ihrer Stellung in der lyotropen Reihe. Ferner zeigt sich, daß Jodid-, Bromid- und Chloridzusatz die Löslichkeit der gealterten Proteine stärker herabsetzen als die der lebensfrischen, was mit dem Verhalten dieser Halogene im neutralen Phosphatpuffer ausgezeichnet übereinstimmt. Infolgedessen verschwindet die als Folge der Breiaufbewahrung bei Extraktion im reinen Acetatpuffer gefundene Löslichkeitssteigerung von 13,4% bei Jodidzusatz fast völlig (3%), bei Bromid- und Chloridzusatz ist sie mit 7 und

9% noch abgeschwächt, dagegen übertrifft sie bei Fluoridzusatz mit 16% Differenz sogar den Ausgangswert im reinen Acetat. Dieses Verhalten der Halogene Jodid, Bromid und Chlorid wurde in den Versuchen 17 und 18 vollauf bestätigt. Diese beiden Versuche zeigen aber ferner, daß das Rhodanid noch stärker als das Jodid in diesem p_H-Bereich die Löslichkeit der frischen und der gealterten Proteine herabsetzt, die der gealterten wiederum stärker als die der lebensfrischen, und am stärksten ist dieser Effekt naturgemäß beim Sulfosalicylat, das ja als freie Säure zu den besten Eiweißfällungsmitteln gehört.

B. Versuche am tätigen Muskel.

Bereits in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß Löslichkeitsänderungen an Muskelproteinen nicht nur im aufbewahrten Muskelbrei, sondern auch im tätigen Muskel nachweisbar werden, daß sie in ihrem Ausmaß durch die Größe der geleisteten Arbeit bestimmt werden, und sie sind auch in der Erholungsphase reversibel (H. J. Deuticke[2]). Bei der Narkose des isolierten Kaltblütermuskels hat kürzlich G. Mönninghoff[5]) ebenfalls solche reversiblen Löslichkeitsänderungen der Muskeltproteine als Ausdruck physikochemischen Geschehens feststellen können. Im Anschluß an die Alterungsversuche erschien es demnach wünschenswert, auch das Verhalten der Proteine ermüdeter Muskeln in den bisher verwandten Extraktionsmitteln zu prüfen.

Das Ergebnis einiger solcher Versuche ist in Tabelle 5 enthalten. In den Versuchen 19 und 20, in denen Kalium-Phosphat vom p_H 7,2 als Extraktionsmittel Verwendung fand, war die Löslichkeit der Proteine durch die Arbeit um 7 bzw. 4,5% herabgesetzt. Jodidzusatz steigerte die Löslichkeit der Proteine des Arbeitsmuskels wie die des gealterten Muskelbreies (siehe Tabelle 2) weniger als die des Ruhemuskels, so daß die Differenzen in der Proteinlöslichkeit zwischen Ruhe- und Arbeitsmuskel auf 13 bzw. 23% anstiegen. Bromid, Chlorid und Fluorid ordnen sich ähnlich wie in den Alterungsversuchen nach der lyotropen Reihe, Bromid- und Chloridzusatz steigern nur im frischen Muskel die Proteinlöslichkeit, sind auf die Proteine des Arbeitsmuskels ohne Einfluß, während Fluoridzusatz bei beiden Muskeln die Proteinlösichkeit mindert. Das Rhodanid steigert wieder

Tabelle 5

Löslichkeit der Proteine des Ruhe- und Arbeitsmuskels im Phosphat und Acetatpuffer bei Halogen- und Rhodanidzusatz.

Versuchs-Nr. / Datum	Arbeitszeit des Muskels in Min. bei 10 g Belastung Rollenabstand des Induktoriums in cm	Puffergemisch zur Extraktion	Löslicher Eiweißstickstoff in % des Muskelgewichtes: Ruhemuskel	Arbeitsmuskel	Änderung der Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im Arbeitsmuskel, bezogen auf Ruhemuskel in %
19	171	6T. m/10 K-Phosphat	u. 1T. H_2O	0,782	0,727	— 7,0
			u. 1T. m/5KJ	0,912	0,792	-13,2
			u. 1T. m/5KBr	0,878	0,728	17,1
11. 1. 38	15—2	p_H 7,2	u. 1T. m/5KCl	0,817	0,696	14,4
			u. 1T. m/5KF	0,760	0,704	7,4
			u. 1T. m/5K-R.	0,972	0,714	26,5
20	180	6T. m/10 K-Phosphat	u. 1T. H_2O	0,775	0,740	4,5
			u. 1T. m/5KJ	0,980	0,760	22,5
			u. 1T. m/5KBr	0,854	0,790	7,5
25. 1. 38	19—2	p_H 7,2	u. 1T. m/5KCl	0,806	0,728	9,7
			u. 1T. m/5KF	0,738	0,718	2,7
			u. 1T. m/5K-R.	0,854	0,641	—25,0
21	240	6T. m/10 Na-Acetat	u. T. H_2O	0,824	1,055	+28,1
			u. T. m/5KJ	0,537	0,526	- 2,1
			u. T. m/5KBr	0,601	0,680	+13,2
2. 2. 38	19—2	p_H 4,2	u. T. m/5KCl	0,704	0,816	+15,9
			u. T. m/5KF	0,706	0,782	+10,8
			u. T. m/5K-R.	0,261	0,246	5,8
22	288	6T. m/10 Na-Acetat	u. 1T. H_2O	0,791	0,914	+15,6
			u. 1T. m/5KJ	0,465	0,476	+ 2,4
			u. 1T. m/5KBr	0,586	0,621	+ 6,0
9. 2. 38	21—2	p_H 4,2	u. 1T. m/5KCl	0,688	0,729	+ 6,0
			u. 1T. m/5KF	0,645	0,701	+ 8,7

erheblich die Löslichkeit der Proteine des frischen Muskels und setzt die des Arbeitsmuskels — wie die des gealterten Muskelbreies (siehe Tabelle 3) — herab, so daß die Unterschiede in der Proteinlöslichkeit zwischen Ruhe- und Arbeitsmuskel auf 25—27% ansteigen.

Auch im Acetatpuffer mit Halogen- und Rhodanidzusatz (siehe Versuche 21 und 22) verhalten sich die Proteine des Arbeitsmuskels ähnlich wie die des gealterten Muskelbreies. Die Löslichkeit der Proteine des Ruhe- und des Arbeitsmuskels wird herabgesetzt durch Rhodanidzusatz am stärksten, durch Jodidzusatz immer noch sehr erheblich. Dabei sind auch hier wieder die Proteine des Arbeitsmuskels stets stärker in ihrer Löslichkeit behindert als die des Ruhemuskels, sodaß die Unterschiede, die im Kontrollansatz mit reinem Acetatgemisch zwischen Ruhe- und Arbeitsmuskel in einer Löslichkeitszunahme von 28 und 16% zum Ausdruck kommen, durch den Rhodanidzusatz in eine Abnahme um 6% verwandelt, durch den Jodidzusatz aufgehoben und durch den Zusatz der übrigen Halogenide abgeschwächt werden. Die geringfügigen Unterschiede, die im Ergebnis der Versuche 19 u. 20 sowie 21 u. 22 bestehen, sind vielleicht dadurch bedingt, daß die durch eine verschieden hohe Reizschwelle anfänglich notwendige verschieden große Stärke des Reizstromes und die ungleiche Arbeitsdauer der Gastrocnemien nicht ohne Einfluß auf das kolloidchemische Geschehen im Arbeitsmuskel sind.

Somit zeigen auch diese in Tabelle 5 mitgeteilten Versuche in Bestätigung der Ergebnisse von H. J. Deuticke[1][2]) und J. Hensay[3]), daß die an den Proteinen des tätigen Muskels erfogenden Änderungen weitgehend ähnlich, vielleicht sogar identisch sind mit denjenigen, die im Muskelbrei bei der Aufbewahrung eintreten. Ferner zeigt sich, daß die zugesetzten Halogenide außer dem Fluorid, das eine gewisse Sonderstellung einnimmt, sowie das Rhodanid und das Sulfosalicylat, auf die bei neutraler Reaktion als Anionen vorliegenden Muskelproteine löslichkeitssteigernd, dagegen auf die bei saurer Reaktion als Kationen vorliegenden Proteine löslichkeitshemmend wirken. Diese Beeinflußbarkeit der frischen Muskelproteine durch zugesetzte Anionen erfährt bei der Muskeltätigkeit eine Änderung: Auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes der Muskelproteine (Myosin p_H 5,0, Myogen p_H 6,3, Myogenfibrin p_H 6,3, Globulin X p_H 5,0 (H. H. Weber[6])) ist die löslichkeitssteigernde Wirkung geannter Anionen darum ungleich geringer oder ganz aufgehoben, und auf der sauren Seite wird die als Folge der Tätigkeit

im reinen Acetatgemisch nachweisbare Löslichkeitszunahme stärker als bei den Proteinen des frischen Muskels eingeschränkt. Es läßt sich mit allem Vorbehalt daraus schließen, daß bei der Muskeltätigkeit an dem für die Löslichkeitsänderungen verantwortlich zu machenden Muskelprotein — es handelt sich wahrscheinlich um die Myosinfraktion (H. H. Weber[6]) — die saure Dissoziation schwächer wird und ein stärker alkalischer Eiweißkörper entsteht, an dessen basischen NH_2-Gruppen vermutlich die zugesetzten Anionen angreifen und die beobachteten Löslichkeitsänderungen erzielen. Aber noch andere Änderungen vorerst unbekannter Art müssen am Muskeleiweiß bei der Tätigkeit erfolgen; denn wenn nur die Zahl der NH_2-Gruppen für die beobachteten Erscheinungen verantwortlich zu machen wäre und bei der Tätigkeit eine Zunahme erführe, würde z. B. die Wirkung des Jodids unverständlich bleiben, dessen Zusatz bei p_H 7,2 die Proteinlöslichkeit im frischen Muskel beträchtlicher steigert als im Arbeitsmuskel. Daß den beobachteten Löslichkeitsänderungen nicht einfach eine Änderung der Molekülgröße zugrunde liegt, hat H. J. Deuticke[7]) durch Bestimmung der Sedimentationskonstanten der löslichen Proteine des Ruhe- und Arbeitsmuskels mittels der Svedbergschen Ultrazentrifuge bewiesen.

C. Versuche unter Zusatz muskeleigener Mononukleotide zum Phosphat-Extraktionsgemisch.

Nachdem durch die Arbeiten der letzten Jahre sehr wahrscheinlich geworden ist, daß die chemischen Veränderungen am Adenylpyrophosphat des Muskels zu einem der Kontraktion recht nahe liegenden Zeitpunkt erfolgen, wurde, von der Erwägung ausgehend, daß diese Änderungen vielleicht physikochemische Zustandsänderungen der Muskelproteine bedingen, noch die Wirkung der Adenylpyrophosphorsäure und ihrer Umwandlungsprodukte, der Muskeladenylsäure und der Inosinsäure, im neutralen Phosphatpuffer auf die Löslichkeit der Proteine des frischen und des gealterten Muskelbreies wie des ermüdeten Muskels geprüft. Die Adenylpyrophosphorsäure war nach der Vorschrift von C. Fiske[8]), die Muskeladenyl-

Tabelle 6

Einfluß von Mononukleotiden auf die Löslichkeit frischer und beanspruchter Muskelproteine im Phosphatpuffergemisch.

Versuchs-Nr. / Datum	Aufbewahrung des Muskelbreies	Arbeitszeit des Muskels in Min. Belastung Rollenabstand	Puffergemisch zur Extraktion: 6T. m/10 K-Phosphat P_H 7,2 und	Löslicher Eiweißstickstoff in % des Muskelgewichtes: Frischer Muskelbrei bzw. Ruhemuskel	Gealterter Muskelbrei bzw. Arbeitsmuskel	Änderung der Löslichkeit des Eiweißstickstoffes im gealterten Muskelbrei bzw. Arbeitsmuskel berechnet auf Frischmuskel bzw. Ruhemuskel in %
23	60' bei 20°		1T. H_2O	0,558	0,525	— 5,9
			1T. adenylpyrophosphorsaures K, enthaltend 135mg%org. H_3PO_4	0,701	0,610	—13,0
			1T. adenylsaures Kalium, enthaltend 45 mg% org. H_3PO_4	0,611	0,560	— 8,4
			1T. inosinsaures Kalium, enthaltend 45 mg% org. H_3PO_4	0,608	0,539	—11,4
8. 7. 38			1T. m/5 K-Jodid	0,654	0,580	—11,3
24	60' bei 20°		1T. H_2O	0,723	0,666	— 7,9
			1T. adenylpyrophosphorsaures K, enthaltend 123 mg% org. H_3PO_4	0,934	0,828	—11,3
			1T. adenylsaures Kalium, enthaltend 46,7 mg% org. H_3PO_4	0,815	0,751	— 7,9
			1T. inosinsaures Kalium enthaltend 42,7 mg% org. H_3PO_4	0,827	0,662	—19,9
22. 2. 38			1T. m/5 K-Jodid	0,917	0,802	—12,4
25	60' bei 17°		1T. H_2O	1,029	0,945	— 8,2
			1T. adenylpyrophosphorsaures K, enthaltend 135 mg% org. H_3PO_4	1,882	1,593	—15,3
			1T. adenylpyrophosphorsaures Kalium enthaltend 45mg%org. H_3PO_4	1,298	1,204	— 7,2
1. 11. 38			1T. adenylsaures Kalium enthaltend 45mg%org. H_3PO_4	0,995	0,943	— 5,2
26		300	1T. H_2O	0,807	0,745	— 7,7
			1T. adenylpyrophosphorsaures K, enthaltend 123mg%org. H_3PO_4	0,985	0,727	—26,2
		10 g	1T. adenylsaures Kalium, enthaltend 45 mg%org. H_3PO_4	0,852	0,758	—11,1
			1T inosinsaures Kalium, enthaltend 45mg%org. H_3PO_4	0,880	0,727	—17,4
1. 3. 38		20—2	1T. m/5 K-Jodid	1,031	0,786	—23,8
27		225	1T. H_2O	0,557	0,534	— 4,1
			1T. adenylpyrophosphorsaures K, enthaltend 135mg%org. H_3PO_4	0,671	0,600	—10,58
		5 g	1T. adenylsaures Kalium, enthaltend 45mg%org. H_3PO_4	0,607	0,550	—9,39
			1T. inosinsaures Kalium, enthaltend 45mg%org. H_3PO_4	0,629	0,533	—15,3
14. 7. 38		16—0	1T. m/ 5K-Jodid	0,708	0,634	—10,5

säure nach G. Embden und M. Zimmermann[9]) und die Inosinsäure nach G. Embden[10]) dargestellt worden. Die betreffenden Barium- bzw. Calciumsalze wurden jeweils in die Kaliumsalze umgesetzt. Da die Salze z. T. schwer wasserlöslich sind, konnte keine m/5 Konzentration erreicht werden, sondern es wurde, von einer ca. m/30 Inosinsäurelösung ausgehend, die etwa 45 mg% org.H_3PO_4 enthält, so gearbeitet, daß die Zusätze von Adenyl- und Adenylpyrophosphorsäure, an ihrem Phosphorsäuregehalt gemessen, an Molarität der Inosinsäure gleich waren. Im übrigen waren Anordnung und Aufarbeitung dieser Versuche die gleichen wie bei den vorher diskutierten; auch wurde wie bei den früher mitgeteilten Rhodanidversuchen (siehe Seite 9—10) jedesmal der Stickstoffgehalt der Puffergemische ermittelt und rechnerisch in Abzug gebracht.

Aus Versuch 23 der Tabelle 6 ist ersichtlich, daß der Zusatz der drei Nucleinsäuren die Proteinlöslichkeit im frischen Muskel gegenüber dem reinen Phosphatpuffer deutlich erhöht. Beim adenylpyrophosphorsauren Kalium ist diese Wirkung am stärksten (ca. + 25%), sogar stärker als beim Jodid (+ 17%), das in diesem Versuch in einem besonderen Ansatz in der vorher verwandten sehr viel höheren und wirksamen m/5 Konzentration mit den Nucleinsäuren verglichen wurde. Adenylsaures und inosinsaures Kalium sind in geringerem aber immer noch deutlichen Umfang wirksam (Steigerung der Löslichkeit gegenüber dem reinen Phosphatpuffer um 9 und 9,5%). Beim gealterten Muskelbrei führt Zusatz von inosinsaurem Kalium zu keinem Unterschied gegenüber dem reinen Phosphatpuffer, während adenylsaures Kalium auch hier eine Löslichkeitserhöhung bewirkt, die beim Adenylpyrophosphat mit 16% Zunahme noch wesentlich stärker hervortritt. Das Adenylpyrophosphat verhält sich also qualitativ wie das Jodid, übertrifft dieses aber, in Anbetracht der verschiedenen verwandten Konzentrationen, bei weitem an Wirksamkeit. Denn der Zusatz einer dem Adenylpyrophosphat äquivalenten m/30 Jodidlösung zum m/10 Phosphatpuffer war niemals von Einfluß auf die Proteinlöslichkeit gewesen. Aus dem verschiedenen Verhalten der zugesetzten Mononukleotide resultiert beim adenylpyrophosphorsauren und beim ionisinsauren Kalium eine

größere Differenz in der Löslichkeit der frischen und der gealterten Muskelproteine, während die Adenylsäure, die ihrer Struktur nach zwischen Ionisinsäure und Adenylpyrophosphorsäure steht, kaum die Unterschiede zwischen frischem und gealtertem Muskelbrei steigert.

Versuch 24, bei dem die absoluten Werte für löslichen Eiweißstickstoff stets höher liegen als im voranstehenden Versuch, da hier Winter-, im Versuch 23 dagegen Sommer-Eskulenten Verwendung fanden (siehe hierüber H. J. Deuticke a.a.O.), bestätigt vollauf das Ergebnis von Versuch 23 mit dem einzigen Unterschied, daß die Differenz zwischen frischem und gealtertem Muskelbrei hier im Ansatz mit Inosinsäure am größten war.

Um Aufschluß darüber zu bekommen, ob die stärkere Löslichkeitsabnahme beim Adenylpyrophosphatzusatz gegenüber dem von adenylsaurem Kalium lediglich auf dem erhöhten Gehalt an organisch gebundener Phosphorsäure beruht, wurde im Versuch 25 beim Adenylpyrophosphat einmal wieder die Konzentration von 135 mg% in Bezug auf org.H_3PO_4 gewählt, die die gleiche Molarität aufweist wie die 45 mg% org.H_3PO_4 enthaltende Lösung von adenylsaurem Kalium, zum anderen wurde die Konzentration des Adenylpyrophosphats auf 45 mg% orgH_3PO_4 herabgesetzt. Dabei ergab sich, daß der niedrig konzentrierte Adenylpyrophosphatpuffer, der also nur den dritten Teil der Molekühleanzahl aber die gleiche Menge organisch gebundener H_3PO_4 enthält wie der Adenylsäurephosphatpuffer, trotzdem noch wirksamer ist als der letztere: die Proteinlöslichkeit im frischen und gealterten Muskelbrei wird deutlich heraufgesetzt, und die Differenz zwischen beiden ist größer als bei Zusatz von Adenylsäure, die in diesem Versuch ohne Einfluß auf die Löslichkeit der frischen und gealterten Proteine blieb, vermutlich deswegen, weil als Folge ausgezeichneten Froschmaterials (frisch gefangene Winter-Temporarien) die absoluten Löslichkeitswerte schon an sich ungewöhnlich hoch lagen. Also ist nicht der Gehalt an organischer Phosphorsäure im Adenylpyrophosphat für dessen hohe Aktivität gegenüber Proteinen verantwortlich zu machen, sondern das Molekül als Ganzes.

Die im Prinzip gleiche Wirkung auf die Löslichkeit und damit den physikochemischen Zustand der Muskelproteine zeigen die Nucleinsäuren in den Versuchen 26 u. 27, in denen statt des frischen und gealterten Muskelbreies Ruhe- und Arbeitsmuskeln untersucht wurden. Im Gegensatz zu den Alterungsversuchen wird hier durch Zusatz der m/30 Nucleinsäuren die Wirksamkeit des m/5 Jodids in Bezug auf absolute Löslichkeitszunahme nicht ganz errreicht, im Versuch 26 liegt bei den Arbeitsmuskeln die Löslichkeit der Proteine im Adenylpyrophosphat- und im Inosinsäureansatz sogar unter dem Phosphatwert, wodurch die Löslichkeitsdifferenzen zwischen ausgeruhtem und ermüdetem Muskel besonders hoch werden. Aber stets erweisen sich auch in diesen Versuchen die Adenylpyrophosphorsäure und die Inosinsäure besonders geeignet, die Unterschiede in der Löslichkeit fricher und beanspruchter Proteine zum Ausdruck zu bringen. Und es ist ausgezeichnet zu erkennen, daß die Umwandlung der Adenylpyrophosphorsäure in Adenylsäure durch Abspaltung von Pyrophosphorsäure bzw. 2 Mol Orthophosphorsäure, ein Vorgang, der sich im tätigen Muskel zu einem dem Hub sehr nahen Zeitpunkt abspielt, auf den physikochemischen Zustand der Muskelproteine von erheblicher Wirkung ist, von größerer Wirkung, als etwa die gleichfalls im tätigen Muskel erfolgende Desaminierung der Adenylsäure zu Inosinsäure.

Überblicken wir die letzten, in Tabelle 6 mitgeteilten Versuche, so bestätigen sie den an den Halogeniden, am Rhodanid und Sulfosalicylat bereits gezeigten Einfluß von Anionen auf den physikochemischen Zustand von Muskelproteinen. Auch die zugesetzten Nucleinsäuren steigern die Löslichkeit der beanspruchten Muskelproteine weniger als die der frischen Proteine; die Seite 16 gemachten Ausführungen gelten demnach auch für diese Versuche. Dabei ist der Einfluß der muskeleigenen Nucleinsäuren, gemessen an den verschiedenen Werten an löslichem Eiweißstickstoff, die durch Zugabe äquimolarer Mengen von Nucleinsäuren zum Extrationsmittel gewonnen wurden, ungleich größer als der der übrigen untersuchten Anionen. Denn die Nucleinsäuren wurden in diesen Versuchen in der sehr viel geringerer Konzentration zugesetzt; sie wirkten in durchaus

physiologischer Konzentration ein, da der Gehalt des Adenylpyrophosphat-haltigen Puffergemisches mit 135 mg% org.H_3PO_4 ziemlich genau der Adenylpyrophosphatkonzentration im frischen Froschmuskel entspricht. Die beobachtete Änderung der Proteinlöslichkeit beim Übergang von Adenylpyrophosphorsäure zur Adenylsäure als Zusatz zum Extraktionsmittel ist sicherlich physiologisch bedeutsam. Denn dieser Übergang von Adenylpyrophosphorsäure in Adenylsäure und gegebenenfalls auch in Ionisinsäure erfolgt auf fermentativem Wege, wie bereits erwähnt, ständig im tätigen Muskel. Es soll zwar keineswegs behauptet werden, daß diese chemischen Änderungen am Nucleinsäuremolekül die physikochemische Zustandsänderung an den Muskelproteinen hervorrufen, die zur Verkürzung und Verhärtung des Muskels führt. Abgesehen davon, daß bei der Bestimmung der Proteinlöslichkeit nicht nur die an den Löslichkeitsänderungen vornehmlich beteiligte Myosinfraktion, sondern auch die Myogenfraktion erfaßt wird, ist zumindest fraglich, ob es eine bestimmte chemische Substanz als kontraktionsauslösenden Faktor überhaupt gibt. Aber auf Grund der in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse möchte ich glauben, daß die Nucleinsäuren des Muskels sicher von Einfluß auf den Zustand der Proteine des intakten Organs sind. Und es ist hier erstmalig gezeigt worden, daß nicht nur Änderungen der H-Ionenkonzentration, sondern auch fermentative Umwandlungen an einer für den Betriebsstoffwechsel des Muskels wichtigen Substanz zu Änderungen im physikochemischen Verhalten der Muskelproteine führen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Löslichkeit lebensfrischer Muskelproteine wird im m/10 K-Phosphatpuffer vom p_H 7,2 durch den Zusatz von K-Jodid zum Extraktionsmittel mit steigender Halogenkonzentration gesteigert. Das Bromid ist in gleichem Maße, aber weniger stark, das Chlorid noch weniger stark wirksam, und Fluorid läßt, in höherer Konzentration dem Phosphatpuffer zugesetzt, die Löslichkeit der frischen Proteine meist unbeeinflußt, setzt sie in niedrigerer Konzentration sogar herab.

2. Auch gegenüber gealterten Muskelproteinen ordnen sich die Halogene entsprechend ihrer Stellung in der lyotropen Reihe, nur wirkt das Jodid hier weniger löslichkeitssteigernd als bei Extraktion lebensfrischer Muskelproteine; und Bromid und Chlorid sind ohne Einfluß. Infolge dieses Verhaltens der Halogene tritt die Minderung, die die Proteinlöslichkeit durch die Alterung des Muskelbreies erfährt, prozentisch im Phosphatjodidpuffer sehr viel stärker, im Phosphatbromid- und Phosphatchloridpuffer immer noch deutlich stärker als im reinen Phosphatpuffer in Erscheinung, während das Fluorid ohne eindeutigen Einfluß ist.

3. Rhodanid, in höherer Konzentration dem Phosphatpuffer zugesetzt, steigert die Löslichkeit der lebensfrischen und hemmt die der gealterten Proteine, sodaß auch hier die Differenz in der Proteinlöslichkeit zwischen beiden steigt; in niedrigerer Konzentration wirkt zugesetztes Rhodanid gleichsinnig auf die frischen und gealterten Eiweißkörper löslichkeitshemmend.

4. Sulfosalicylat steigert bei Zusatz zum Phosphatpuffer vom p_H 7,2 in sämtlichen untersuchten Konzentrationen die Löslichkeit der frischen und gealterten Proteine und läßt in den höheren Konzentrationen die Unterschiede in der Löslichkeit frischer und gealterter Proteine stärker in Erscheinung treten.

5. Im sauren Acetatpuffer von p_H 4,2 setzen zugesetzte Halogenide die Löslichkeit der frischen und gealterten Proteine herab, das

Jodid am stärksten, das Fluorid im schwächsten. Hier ist der Einfluß auf die gealterten Proteine stärker als auf die frischen, so daß die Löslichkeitsvermehrung, die gealtertes Muskeleiweiß bei Extraktion im sauren Acetat aufweist, durch den Jodidzusatz fast völlig aufgehoben, durch Bromid- und Chloridzusatz noch merklich eingeschränkt wird. Rhodanid und Sulfosalicylat wirken im sauren Acetat auf frische und gealterte Muskeleiweißkörper löslichkeitshemmend.

6. Die Proteine von Arbeitsmuskeln zeigen in den gleichen Puffergemischen das gleiche Verhalten wie die des gealterten Muskelbreies. Die bei der Tätigkeit an den Muskeleiweißkörpern erfolgenden Änderungen sind demnach den bei der Alterung vor sich gehenden weitgehend ähnlich, wenn nicht mit ihnen identisch. Aus dem Verhalten der beanspruchten Proteine werden mit Vorbehalt Rückschlüsse gemacht über die Natur der bei der Tätigkeit bzw. Alterung am Eiweißmolekül erfolgenden Änderungen.

7. Adenylpyrophosphorsäure, Adenylsäure und Inosinsäure, als Kaliumsalze in physiologischer Konzentration einem Pphosphatpuffer von p_H 7,2 zugesetzt, sind von größtem Einfluß auf die Löslichkeit und damit den physikochemischen Zustand frischer und durch die Tätigkeit bzw. Alterung beanspruchter Muskelproteine. Sie steigern ähnlich wie das Jodid, nur ungleich stärker als dieses, die Löslichkeit der frischen Proteine in höherem Umfang als die der beanspruchten Proteine, das Adenylpyrophosphat weitaus stärker als Adenylsäure und Inosinsäure. Es wird daraus geschlossen, daß die im tätigen Muskel am Adenylpyrophosphat erfolgenden fermentativen Umsetzungen für den physikochemischen Zustand der Muskelproteine von großer Bedeutung sind.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. H. J. Deuticke: Pflügers Arch. *224* 1 (1930).
2. H. J. Deuticke: Z. physiol. Chem. *210* 97 (1932).
3. J. Hensay: Pflügers Arch. *224* 44 (1930).
4. G. Kopyloff: Pflügers Arch. *153* 222 (1913).
5. G. Mönninghoff: Über den Einfluß der Phenylurethannarkose auf die Löslichkeit der Proteine im isolierten Froschmuskel. Inaugural-Dissertation Bonn 1938.
6. H. H. Weber: Ergebnisse der Physiologie. *36* 109 (1934).
7. H. J. Deuticke: Z. physiol. Chem. *224* 216 (1934).
8. C. H. Fiske: Science (N.Y.) 1929 II 381.
9. G. Embden u. M. Zimmermann: Z. physiol. Chem. *167* 137 (1937).
10. G. Embden: Z. physiol. Chem. *210* 194 (1932).

Herrn Prof. Dr. Deuticke danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Anregungen während meiner Arbeit.

LEBENSLAUF.

Am 25. Dezember 1900 wurde ich, Dorothea Gebers, geb. Mellinghoff, zu Mülheim-Ruhr als Tochter des Kaufmanns Hermann Mellinghoff und seiner Ehefrau Dorothea geb. Klingenburg geboren. Von Ostern 1907 bis Ostern 1916 besuchte ich das Städt. Lyzeum zu Mülheim-Ruhr, von da ab die realgymn. Studienanstalt zu Duisburg, wo ich im Februar 1920 die Reifeprüfung ablegte. Nach anderthalbjähriger Tätigkeit in Haushalt und Krankenhaus heiratete ich Herbst 1921 den Kaufmann Wilhelm Gebers in Dortmund. Die Ehe wurde nach 12 Jahren geschieden. Herbst 1932 zog ich mit meinen Kindern nach Aachen, machte dort das Examen als staatlich geprüfte Massörin, siedelte 1934 nach Bonn über und begann hier das Studium der Medizin. Nach zwei Semestern legte ich den ersten, nach weiteren drei Semestern den zweiten Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung ab. Nach zehn Studiensemestern machte ich hier SS. 1939 das Staatsexamen. Während meiner ganzen Studienzeit war ich in Bonn immatrikuliert.